

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 829**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2008 E 08852388 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2227692**

54 Título: **Identificación de microorganismos patógenos en fluidos corporales**

30 Prioridad:

23.11.2007 DE 102007056583
05.12.2007 DE 102007058516

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2016

73 Titular/es:

BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)
FAHRENHEITSTRASSE 4
28359 BREMEN, DE

72 Inventor/es:

WELLER, ULRICH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

ES 2 564 829 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Identificación de microorganismos patógenos en fluidos corporales

5 La invención se refiere a la identificación de microorganismos patógenos infecciosos, especialmente virus, bacterias y otros microorganismos.

10 La invención proporciona un método para identificar microorganismos patógenos de infecciones agudas sin necesidad de realizar un cultivo previo en un medio nutritivo externo mediante la espectrometría de masas de los perfiles proteínicos obtenidos de microorganismos patógenos sedimentados a través de precipitación directa desde el fluido corporal mediante centrifugado. Con este método se pueden identificar los microorganismos patógenos que causan infecciones agudas en menos de una hora.

15 Estado de la técnica

20 Numerosos tipos de microorganismos (a los que en adelante también se hará referencia como microbios), en particular las bacterias y los hongos unicelulares, se pueden identificar muy fácilmente mediante un proceso de espectrometría de masas de reciente introducción en el que pequeñas cantidades de microbios de una colonia cultivados del modo habitual en un medio nutritivo se transfieren a una placa de soporte de muestras para espectrometría de masas y a continuación se someten directamente a un análisis por espectrometría de masas. El espectro de masa muestra principalmente las diferentes proteínas, siempre que estén presentes en los microbios en una concentración suficiente. La identidad se determina a continuación a partir del perfil proteínico del microbio mediante la consulta de colecciones de espectros que contienen miles de espectros de referencia.

25 El medio nutritivo suele hallarse en gelatina húmeda en una placa de Petri, y se obtienen colonias separadas de cepas puras a partir de muestras obtenidas con un hisopo del modo habitual mediante cultivo de seis a veinte horas aproximadamente, dependiendo del ritmo de crecimiento de los microbios. Aunque las colonias se solapan o se mezclen, se pueden obtener colonias puras, también del modo habitual, mediante un segundo cultivo. Una cantidad del cultivo microbiano se transfiere con una pequeña espátula, barra o mano de mortero de una colonia seleccionada a la placa de soporte de muestras para espectrometría de masas y se rocía con una disolución de una matriz convencional para la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). El disolvente orgánico de la disolución de la matriz suele penetrar en las células microbianas y las destruye por ósmosis. A continuación la muestra se seca mediante evaporación del disolvente, lo que conduce a la cristalización de la matriz disuelta. Las proteínas solubles y, hasta cierto punto, otras sustancias celulares se incorporan como moléculas de analito al cristal de la matriz.

40 Los cristales de la matriz con las moléculas de analito incrustadas se exponen a la luz de un láser pulsado en un espectrómetro de masas, lo cual ioniza las moléculas de analito. Los iones de analito pueden entonces medirse de acuerdo con su masa en el espectrómetro de masas. Para este fin se usan preferentemente los espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo. El espectro de masa es el perfil de los valores de masa y las intensidades de estos iones de analito. Predominan los iones de proteínas; la información más útil se encuentra en el intervalo de masas de 3000 a 15000 daltonios aproximadamente. En este método casi todos los iones de proteínas llevan solo una carga simple (número de cargas $z = 1$), lo que significa que aquí es posible hablar simplemente de la masa m de los iones en vez de usar siempre el término «cociente de masa/carga», m/z , como por otro lado es habitual —y necesario— en la espectrometría de masas.

50 Este perfil proteínico es muy característico de cada microbio, porque cada especie microbiana produce sus propias proteínas codificadas genéticamente, cada una de ellas con una masa característica. Los perfiles proteínicos son característicos de los microbios al igual que las huellas dactilares lo son de las personas. Hoy en día se están desarrollando colecciones fiables de espectros de masa de los perfiles proteínicos de los microbios, aptas para aplicaciones médicas y legales (las denominadas «colecciones validadas»), con la colaboración de muchas instituciones, incluidas compañías de diagnóstico, institutos universitarios, hospitales e institutos nacionales.

55 Este método de identificación ha demostrado una eficacia extraordinaria. Proporciona una certeza sobre la correcta identificación muy superior a la que permitían los métodos de identificación microbiológica utilizados en el pasado. Se ha demostrado que la fiabilidad de la identificación se sitúa muy por encima del 95% para cientos de tipos de microbios diferentes. No obstante, fue difícil determinar adecuadamente la fiabilidad porque los microbios de las colecciones conocidas se habían identificado incorrectamente en no pocos casos. Al final, solo con la secuenciación genética se puede establecer la identificación más allá de toda duda, lo que ha confirmado la identificación mediante espectrometría de masas en la gran mayoría de los casos.

60 En muchos casos este sencillo procedimiento permite distinguir incluso cepas estrechamente emparentadas de la misma especie microbiana, ya que las proteínas presentes en los microbios están codificadas genéticamente y pueden variar de forma clara entre cepas. Las pequeñas variaciones en la huella genética provocan necesariamente proteínas con una estructura diferente y masas que difieren de las proteínas no codificadas genéticamente;

presentan, por tanto, un perfil proteínico diferente, siempre que la concentración de proteínas con masa modificada en los microbios sea suficiente para producir una señal suficientemente fuerte para el análisis por espectrometría de masas. Ya ha sido posible corregir de esta forma clasificaciones taxonómicas y relaciones de microbios.

5 Si una colección no incluye ningún espectro de masa de referencia para la especie microbiana concreta que se está analizando (lo que ocurre a menudo, dado que existen cientos de miles de especies microbianas y que las colecciones de espectros disponibles hasta el momento tienen un tamaño limitado), se pueden realizar búsquedas en la colección con requisitos de similitud más laxos para obtener al menos alguna indicación sobre la clase, familia o género de los microbios, ya que los microbios emparentados contienen con frecuencia muchos tipos de proteínas idénticos.

10 En el caso de los iones de proteínas de especies microbianas idénticas las masas son, por su naturaleza, siempre idénticas y, por tanto, estrictamente reproducibles, pero las intensidades de las señales proteínicas se reproducen solo de forma aproximada. El uso de diferentes medios nutritivos para el cultivo influye en el metabolismo de los microbios y, por tanto, en la producción de las diferentes proteínas en proporciones variables y, así, en su concentración e intensidad en el perfil proteínico. No obstante, el efecto no es fuerte. Las variaciones de intensidad no interfieren en la identificación, siempre que se utilice un programa informático adecuado. De igual forma, la madurez de las colonias influye en las intensidades relativas de las señales de las proteínas en los espectros de masa y también aquí el efecto es reducido. Solo se encuentran espectros de masa característicamente diferentes de la misma especie microbiana en el caso de microbios que pueden adoptar formas de vida diferentes, como los esporuladores: las esporas presentan perfiles proteínicos diferentes de las células normales. No obstante, si se utilizan microbios cultivados recientemente, la diferencia no es importante.

15 Los programas informáticos para consultar las colecciones y realizar comparaciones entre espectros pueden lidiar con las variaciones de intensidad, que solo tienen aquí un papel secundario. Como se ha apuntado anteriormente, la identificación de microbios con estos programas es muy fiable. Los programas funcionan sin identificar las proteínas individuales implicadas (lo cual requeriría los espectros de fragmentos iónicos), utilizando solo la similitud de los espectros de masa. En la búsqueda por similitud, tienen mucha más importancia las masas que las intensidades. Hasta es posible que algunas proteínas no aparezcan en los espectros de masa (debido a una intensidad muy baja) sin que ello interfiera en la determinación de la similitud: la coincidencia de los valores de masa de una gran mayoría de las proteínas basta para la identificación. Habitualmente los espectros de la colección contienen información sobre qué señales proteínicas deben estar siempre presentes, por ejemplo, estableciendo umbrales para la intensidad o documentando la probabilidad de detectar las señales proteínicas mediante la observación en registros espectrales repetidos con frecuencia de diferentes muestras.

20 Los espectros de referencia en las colecciones de espectros pueden, por ejemplo, contener las masas, las tolerancias de masa, las intensidades medias, las desviaciones estándares de las intensidades y las probabilidades de aparición de las señales proteínicas individuales. En general, los espectros de referencia se obtienen de mediciones sin procesar realizadas con frecuencia, preferentemente de cultivos diferentes, mediante evaluación automática con ordenador; no obstante, estas mediciones también se pueden reducir incluyendo conocimiento adicional sobre los microbios (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes DE 100 38 694 A1 y DE 103 00 743 A1, W. Kallow et al.).

25 El método descrito brevemente arriba, en el que se hace un frotis de unos pocos microbios de una colonia en un punto dispuesto al efecto sobre un soporte de muestras para espectrometría de masas y a continuación se rocía con disolución de una matriz, es el método más sencillo de preparación de muestras y, hasta el momento, el más rápido. El proceso también se puede automatizar con la ayuda de los robots de pipeteo con reconocimiento de imagen para su uso en laboratorios de rutina. Tras cultivar una colonia que es meramente visible, se requieren solo una o dos horas para lograr una identificación completa, aunque deban analizarse simultáneamente cientos de muestras. Se han comercializado placas de soporte de muestras para espectrometría de masas para 96 o 384 muestras; el registro de estos espectros de masa requiere entre media hora y dos horas aproximadamente. Para trabajos urgentes, se pueden identificar muestras individuales de microbios en unos pocos minutos, aunque primero es preciso realizar el cultivo, que siempre lleva algo de tiempo.

30 Se han estudiado otros métodos de preparación de muestras, como la extracción de las proteínas tras destruir los microbios en un tubo mediante ultrasonidos o los métodos de extracción de las proteínas tras disolver las paredes celulares, a veces resistentes, utilizando fuertes ácidos. Estos métodos de descomposición se utilizan cuando el método normal de frotis microbiano falla porque las paredes celulares microbianas no están destruidas cuando se rocía con la disolución de la matriz. Si con el método normal se obtienen suficientes espectros de masa adecuados para una comparación, los métodos de descomposición ofrecen resultados muy parecidos al método de frotis simple, pero a menudo presentan espectros de masa más claros con menos interferencia de fondo. Con ambos métodos se obtienen espectros de masa que permiten identificar los microbios utilizando la misma colección de espectros de masa de referencia.

35 Hoy en día los espectros de masa de las proteínas microbianas se registran utilizando los espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo en modo lineal, debido a su sensibilidad de detección especialmente elevada,

5 aunque la resolución y precisión de masa de los espectros de los espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo que funcionan en modo reflector es significativamente mayor. No obstante, en el modo reflector solo aparecen en torno a una vigésima parte de las señales de iones y la sensibilidad de detección es hasta dos órdenes de magnitud inferior. El motivo de esta elevada sensibilidad es que cuando un espectrómetro de masas con
10 analizador de tiempo de vuelo está funcionando en modo lineal no solo se detectan los iones estables, sino también los fragmentos iónicos generados por la descomposición de un ion «metaestable». Se utilizan multiplicadores de electrones secundarios para medir los iones y, en consecuencia, se miden incluso partículas neutras creadas durante el proceso como resultado de la descomposición de iones por parte del detector de iones, dado que estas también generan electrones secundarios al impactar. Todos estos fragmentos iónicos y partículas neutras creados a partir de una especie progenitora de iones tienen la misma velocidad que el ion progenitor y, por tanto, alcanzan el detector de iones al mismo tiempo. La hora de llegada es una medida de la masa de los iones intactos originales.

15 Para muchas aplicaciones la elevada sensibilidad de detección reviste tal importancia que se aceptan muchas de las desventajas del funcionamiento lineal del espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo, como una resolución de masa significativamente más reducida. Para estas aplicaciones se incrementa la energía del láser de desorción e ionización, lo cual aumenta el rendimiento iónico, pero también disminuye su estabilidad, si bien eso no tiene mucha importancia a este respecto.

20 El registro de espectros de masa con espectrómetros de masas con analizador de tiempo de vuelo suele requerir el registro y digitalización en sucesión rápida de un gran número de espectros aislados, con el resultado habitual de un espectro suma fruto de la adición de las mediciones con el mismo tiempo de vuelo. Los iones de cada espectro individual se generan mediante un disparo de un láser pulsado de UV. Este método de generación de espectros suma es necesario debido al reducido intervalo dinámico en un espectro individual. Se registra un mínimo de 50 y en algunos casos incluso 1000 o más espectros individuales; un espectro suma está formado en general por varios
25 cientos de espectros individuales que se pueden registrar y sumar en unos pocos segundos en los espectrómetros de masas modernos. El tiempo total requerido para registrar un espectro suma depende del número de espectros individuales y de la frecuencia de disparo del láser utilizado. Actualmente se utilizan para este propósito láseres que disparan con una frecuencia de entre 20 y 200 hercios, pero otros componentes electrónicos, como, por ejemplo, los voltajes de aceleración retardada, deben también cambiarse de forma correspondiente, determinando así la aplicabilidad de láseres más rápidos. Si se utilizan procesos de velocidad media, se requiere un intervalo de entre 2 y 30 segundos para registrar un buen espectro suma.

35 En los campos de aplicación mencionados más arriba se miden espectros de masa que van desde aprox. 1000 daltonios hasta los elevados intervalos de masas de 20000 daltonios, por ejemplo. Se ha descubierto que las señales de masas en el intervalo más bajo de masas (de hasta aproximadamente 2500 daltonios) no se pueden evaluar de forma eficaz, ya que se originan en péptidos no específicos unidos externamente y otras sustancias cuya presencia tiende a ser aleatoria y variable. En cuanto al frotis de microbios en la placa de soporte de muestras, los mejores resultados se obtienen cuando solo se evalúan las señales de masas en el intervalo de 3000 a 15000 daltonios aproximadamente. En el caso de microbios descompuestos tras una exhaustiva limpieza en tubos de centrifugado y transferencia del líquido de descomposición a una placa de muestras con una fina capa de la matriz ya preparada, se puede utilizar el intervalo de masas de 1000 a 15000 daltonios, ya que los espectros resultantes son mucho más claros y de más fácil reproducción en el intervalo de masas más bajo.

45 Debido a la baja resolución de masa mencionada arriba, los grupos isótopos no pueden distinguirse en estos intervalos de masas. Los grupos isótopos consisten en señales de iones que solo difieren en un daltonio. Únicamente se miden las envolturas de los grupos isótopos. No obstante, también se conocen métodos de espectrometría de masas que ofrecen una mayor resolución y precisión de masa, pero se desconoce aún si con ellos se pueden lograr niveles de sensibilidad comparables.

50 Este método de identificación de microbios suele requerir un cultivo puro de microbios para obtener un espectro de masa que no sea ocultado por las señales de otros microbios. Sin embargo, se ha observado que pueden evaluarse los espectros de masa de mezclas de dos especies microbianas e identificarse ambas especies. La fiabilidad de la identificación solo se ve afectada levemente. Si se incluyen más de dos especies microbianas en el espectro de masa, la probabilidad y fiabilidad de la identificación se reducen de forma considerable.

55 El sencillo método de identificación de microbios mediante espectrometría de masas puede tener aplicaciones en muchos campos, como la supervisión de agua potable o el control de calidad en la producción de alimentos. En la producción de alimentos, las especies de microorganismos presentes son clave para determinar si los alimentos pueden consumirse sin riesgos. Solo hay que pensar en los dañinos estafilococos, estreptococos o la salmonela, que deben detectarse mediante continuos controles. Por otro lado, la cerveza, el vino, el queso y el yogur no podrían crearse sin el útil trabajo de miles de millones de microbios. La pureza de las cepas es esencial para su uso.

60 En el ámbito médico se requiere una supervisión especialmente rigurosa y fiable. Los microorganismos patógenos deben mantenerse fuera de los hospitales. La supervisión constante de los microbios y su identificación es un estricto requisito legal para los quirófanos, por ejemplo.

La identificación de microbios causantes de enfermedades infecciosas desempeña un importante papel. A este respecto es importante poder identificar muy rápidamente los microorganismos patógenos para que se pueda realizar inmediatamente la intervención médica adecuada. A pesar de la necesidad de realizar primero cultivos microbianos, el método de identificación mediante espectrometría de masas es uno o dos días más rápido que los métodos microbiológicos empleados hasta ahora. No obstante, aún son necesarias de 12 a 24 horas aproximadamente y, si fuera necesario un segundo cultivo, el periodo requerido aumentaría considerablemente. Para muchas aplicaciones, en particular en el caso de infecciones agudas, este periodo es demasiado largo y urge encontrar procedimientos más rápidos.

En WO 2002/021,108 A2 (N. G. Anderson y N. L. Anderson) se presenta un método para extraer, separar y purificar microbios —virus incluidos— mediante ultracentrifugado bidimensional directamente de fluidos corporales o tejido homogeneizado. En una primera fase del centrifugado se extraen todas las partículas con una velocidad de sedimentación más elevada que la de los microbios a identificar. En la segunda fase de ultracentrifugado se lleva a cabo un bandeado isopícnico en los líquidos incorporados para formar un amplio gradiente de densidad, utilizando tubos de centrifugado dentados especiales. Los microbios distribuidos en microbandas se pueden reconocer y extraer mediante complejos aparatos, lavar e incluso centrifugar una vez más tras el lavado para formar sedimentos, con el fin de preparar muestras que contengan un solo tipo de microbios para diferentes tipos de procedimientos de análisis. «Una vez los virus de una muestra biológica están altamente purificados y concentrados mediante la técnica de centrifugado bidimensional tal y como se describe más arriba, utilizando tubos de centrifugado para separación en microbandas, los virus se pueden utilizar en muchos otros ensayos» (página 17, línea 7). Entre los numerosos tipos diferentes de ensayos enumerados en la patente, también se menciona el análisis por espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz, con una breve descripción del procedimiento de frotis en placas de muestras añadiendo disolución de una matriz, de acuerdo con una publicación especializada citada. Esta patente publicada es una extraordinaria descripción de los diversos procedimientos de centrifugado que se pueden aplicar a los fluidos corporales para obtener especies microbianas separadas en complejas mezclas de microbios. Resulta interesante que las reivindicaciones se refieren solo a los métodos y aparatos para detectar y localizar la luz emitida o dispersa por las muestras distribuidas en microbandas en un tubo de centrifugado con el fin de detectar las microbandas de difícil observación.

En un estudio de Letarte et al. («Py-MAB-TOF detection and Identification of microorganisms in urine», *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2004, vol. 71, n.º 1, págs. 13-25) se describe un enfoque basado en el uso de pirólisis combinada con espectrometría de masas (Py-MS) para la detección e identificación de bacterias en muestras de orina y otras muestras acuosas en el que las muestras se centrifugan sin necesidad de realizar un cultivo.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar un método con el que se pueden identificar microorganismos patógenos infecciosos en fluidos corporales, a ser posible en solo una hora aproximadamente.

Breve descripción de la invención

La invención se basa en el hecho sorprendente de que, en la gran mayoría de los casos (muy por encima del 70%), las infecciones agudas en fluidos corporales se atribuyen a una sola especie de microorganismos patógenos que ha hiperproliferado con respecto al resto de especies microbianas y de que estos microorganismos patógenos están siempre presentes en concentraciones muy elevadas, generalmente entre 10^4 y 10^8 microorganismos patógenos por mililitro. En una pequeña proporción de alrededor del 15%, dos especies de microorganismos patógenos están presentes en tales cantidades que ambas pueden detectarse en los espectros de masa. Esta exclusividad de los tipos de microorganismos patógenos presentes en infecciones agudas contrasta con la presencia de microbios en o sobre el cuerpo humano en otras circunstancias. Por ejemplo, las 10^{14} bacterias que se encuentran habitualmente en los intestinos humanos se distribuyen en al menos 400 especies bacterianas que conviven en equilibrio.

La invención consiste en precipitar directamente los microorganismos patógenos causantes de una infección aguda desde el fluido corporal, por ejemplo, mediante centrifugado durante un intervalo de 5 a 10 minutos a una velocidad de al menos 10000 r.p.m. y, posiblemente después de una fase optativa de lavado seguida de otro centrifugado, análisis de los microorganismos patógenos sedimentados mediante espectrometría de masas. Un método preferido consiste en descomponer los microorganismos patógenos en el sedimento precipitado mediante ácidos y disolventes orgánicos, centrifugarlos una vez más y someter a análisis por espectrometría de masas al fluido de descomposición sobrenadante que contiene las proteínas. Por los motivos presentados anteriormente, el análisis por espectrometría de masas conduce en la mayoría de los casos a espectros de masa de una sola especie de microorganismos patógenos y, en un número mucho menor de casos, a espectros de masa de mezclas de dos especies de microorganismos patógenos. Solo en casos aislados resulta imposible evaluar los espectros de masa debido a la presencia de más de dos especies de microorganismos patógenos. Por lo tanto, habitualmente los espectros de masa se pueden evaluar de forma satisfactoria; el procedimiento es extremadamente rápido. Si se dispone de inmediato de un espectrómetro de masas y se optimiza el tiempo de trabajo, se puede realizar en un intervalo de 20 a 30 minutos aproximadamente.

- 5 Para obtener sedimentos mediante precipitación directa a veces es necesario añadir algunos fluidos de baja densidad como el agua, el metanol u otros a fin de reducir la densidad del fluido corporal a un valor inferior a la densidad de los microorganismos patógenos. No obstante, los líquidos añadidos deben mantener intactos los microorganismos patógenos, de forma que se precipiten microorganismos patógenos intactos. A diferencia de WO 2002/021,108 A2, se evita la formación de microbandas isopícnicas porque las microbandas requieren complejos aparatos para su reconocimiento y extracción del líquido, aunque ello signifique que se precipiten algunas mezclas de microorganismos patógenos con otros microorganismos patógenos u otras partículas de fluidos corporales.
- 10 Este método se puede aplicar directamente y de forma satisfactoria a todos los fluidos corporales transparentes como la orina, el líquido lacrimal, la secreción nasal, la linfa, el líquido sinovial o el líquido cefalorraquídeo. En los fluidos corporales que contienen corpúsculos, como la sangre total o la secreción de un absceso, se puede incluir una fase intermedia para la destrucción de los corpúsculos.
- 15 En las infecciones agudas suele haber elevadas concentraciones de microorganismos patógenos. Por ejemplo, en el caso de inflamación de las vías urinarias o los riñones, un mililitro de orina contiene de 10^5 a 10^7 microorganismos patógenos aproximadamente. Puesto que solo se requieren de 10^3 a 10^4 microbios aproximadamente para un análisis por espectrometría de masas, mediante el centrifugado se obtendrán inmediatamente cantidades suficientes de microorganismos patógenos para la identificación por espectrometría de masas.
- 20 Si la muestra centrifugada contiene más de 10^5 microorganismos patógenos microbianos, los sedimentos depositados se pueden apreciar a simple vista. Pero, aunque haya menos microorganismos patógenos microbianos en el fluido corporal, se pueden aplicar con éxito métodos de rápida extracción y descomposición para los sedimentos en ese caso invisibles. Los procesos de extracción de las proteínas de los microorganismos patógenos son muy rápidos y solo añaden unos pocos minutos a la duración total del análisis.
- 25 También es posible, si se emplean las medidas y aditivos adecuados, cultivar los microorganismos patógenos directamente en el fluido corporal, como, por ejemplo, con el conocido método de «cultivo sanguíneo», incubando directamente la bolsa de sangre total. Este tipo de cultivo es considerablemente más rápido que los cultivos en placas de Petri y a menudo proporciona, en particular en el caso de infecciones con carga patógena elevada, suficientes microorganismos patógenos para la identificación en el plazo de una hora.
- 30 Las infecciones agudas también pueden estar provocadas por microorganismos patógenos no microbianos como los virus y las bacterias *Chlamydia* y *Rickettsia*, ninguno de los cuales puede cultivarse en un medio nutritivo, ya que solo se multiplican en células huésped. En las infecciones agudas, ciertas formas de estos microorganismos patógenos se encuentran en concentraciones extremadamente elevadas en fluidos corporales y, a pesar de su pequeño tamaño, pueden precipitarse de forma eficaz en una ultracentrifugadora. Se ha demostrado asimismo que se pueden identificar a través de sus proteínas específicas, medidas mediante espectrometría de masas. En los fluidos corporales los virus están presentes en forma de viriones. Estos viriones poseen envolturas proteínicas muy características en forma de cápside, dentro de la cual queda protegido el ARN o el ADN del virus. Gracias a su especificidad, las proteínas de la envoltura se pueden identificar mediante espectrometría de masas. A veces también se observan lipoproteínas de una envoltura lipoproteínica. Las bacterias *Chlamydia* se encuentran en el fluido corporal en una forma extracelular como «cuerpos elementales»; tanto estas como las formas parecidas de *Rickettsia* llevan sus propias proteínas.
- 35 Los virus también se pueden identificar mediante un análisis por espectrometría de masas de su ARN o ADN, si este se descompone mediante métodos especiales de digestión enzimática.
- 40 Preparaciones preferidas
- 45 La invención proporciona un método básico para la identificación de microorganismos patógenos infecciosos microbianos y no microbianos en fluidos corporales que es considerablemente más sencillo y rápido que los métodos previos, la mayoría de los cuales incluyen el cultivo de colonias microbianas en medios nutritivos en placas de Petri. El método de acuerdo con la invención se puede incluso aplicar a virus, *Chlamydia* y *Rickettsia* para los cuales el cultivo de colonias en medios nutritivos no es posible, ya que solo proliferan dentro de células huésped. El método básico de acuerdo con la invención consiste en la separación de los microorganismos patógenos (incluidos los virus) de un fluido corporal en el que se sospecha la infección mediante el centrifugado con la obtención de sedimentos de los microorganismos patógenos y el análisis por espectrometría de masas de sus proteínas para la identificación, por ejemplo, aplicando la desorción láser asistida por matriz al frotis de microorganismos patógenos de las placas de soporte de muestras.
- 50 Si los microorganismos patógenos tienen una densidad baja, puede que la precipitación directa en una centrifugadora no sea posible. Por lo tanto, para obtener sedimentos por precipitación directa a veces es necesario añadir algunos fluidos de baja densidad como el agua, el metanol u otros a fin de reducir la densidad del fluido corporal a un valor inferior a la densidad de los microorganismos patógenos. No obstante, los líquidos añadidos deben mantener intactos los microorganismos patógenos, de forma que se precipiten microorganismos patógenos intactos.
- 55
- 60
- 65

La invención se basa en la precipitación directa de los microorganismos patógenos formando sedimentos, en claro contraste con WO 2002/021,108 A2, que trata la formación de microbandas isopícnicas mediante ultracentrifugado. Aquí se evitan las microbandas porque estas requieren aparatos complejos para su identificación y extracción del líquido.

5 Un derivado preferido del método básico incluye la extracción de las proteínas de los microorganismos patógenos sedimentados cuando aún están dentro del tubo de centrifugado, centrifugando una vez más para precipitar las paredes del microorganismo patógeno y otras partículas que no se disuelven y sometiendo las proteínas disueltas en el fluido sobrenadante al proceso de identificación mediante espectrometría de masas de los microorganismos patógenos.

El análisis por espectrometría de masas del fluido sobrenadante puede basarse en una ionización de las proteínas mediante electronebulización o mediante desorción láser asistida por matriz.

15 Otro derivado del método básico de acuerdo con la invención consiste en el cultivo de microorganismos patógenos en el fluido corporal mediante incubación, posiblemente tras la adición de algunos nutrientes, antes de que los microorganismos patógenos se centrifuguen formando sedimentos y sean sometidos a la identificación mediante espectrometría de masas.

20 Los microorganismos patógenos se separan con extrema facilidad mediante un breve centrifugado de entre 5 y 10 minutos. Los virus requieren la mayor potencia de una ultracentrifugadora. El sedimento de microorganismos patógenos resultante puede a continuación lavarse una o dos veces, preferentemente con agua destilada, para extraer una elevada proporción de cualquier proteína asociada y de otras impurezas del fluido corporal. El proceso de centrifugado se repite tras cada fase de lavado. Si el sedimento se aprecia a simple vista, eso significa que contiene al menos unos 10^5 microorganismos patógenos microbianos aproximadamente.

25 En el caso de un sedimento visible, en la mayoría de los casos basta con realizar un frotis de la muestra en el soporte para obtener una identificación satisfactoria. El sedimento con los microorganismos patógenos separados se puede depositar en un portador de muestras para espectrometría de masas mediante una pequeña espátula o una pequeña barra, rociar con una disolución de matriz y a continuación colocar en el espectrómetro de masas tras el secado y cristalización de la matriz. En general, la disolución de la matriz penetra en los microorganismos patógenos, provocando que estallen a causa de los efectos de la ósmosis. Cuando la muestra se seca, se forman pequeños cristales de matriz y durante este proceso de cristalización se incrustan las proteínas patógenas.

35 No obstante, este procedimiento no siempre es recomendable por varios motivos. Por ejemplo, se requiere extracción y descomposición si no se puede hacer un simple frotis de los microorganismos patógenos del sedimento en la placa de soporte de muestras, por ejemplo porque los microorganismos patógenos crean una pulpa viscosa que no se adhiere. Otro motivo es que algunas especies de microorganismos patógenos tienen paredes celulares tan resistentes que no se destruyen por la fuerza osmótica cuando se exponen al disolvente orgánico en la disolución de la matriz sobre la placa de muestras. En todos estos casos es necesaria la descomposición de los microorganismos patógenos con extracción de las proteínas, si bien esto tampoco dura más de unos pocos minutos. Si el sedimento no es visible, se recomienda siempre la descomposición.

40 Sin embargo, el motivo más importante para aplicar el proceso de descomposición es el riesgo de infección del personal del laboratorio. Se debe tener especial cuidado con el material infeccioso, como el médico de laboratorio bien sabe. Debido al riesgo de infección, es por tanto adecuado inactivar los microbios de alguna forma apropiada sin cambiar al mismo tiempo las proteínas hasta el punto de imposibilitar la identificación por medio del perfil proteínico. De nuevo el método de extracción descrito más adelante en detalle ofrece un método para aplicar estas precauciones higiénicas.

45 Los sedimentos con los microorganismos patógenos separados se someten dentro del tubo de centrifugado a un proceso de extracción de las proteínas antes del análisis por espectrometría de masas, añadiendo los ácidos y disolventes orgánicos apropiados. Los ácidos debilitan las paredes celulares y los disolventes orgánicos penetran en los microorganismos patógenos por ósmosis, haciendo que estallen y contribuyendo a disolver las proteínas internas. El proceso de extracción también se conoce como proceso de descomposición.

50 En concreto, la descomposición se puede lograr, por ejemplo, a través del siguiente protocolo: mientras aún está en el recipiente de centrifugado (p. ej., un tubo Eppendorf), el sedimento se disuelve removiendo con cuidado con unos pocos microlitros de ácido fórmico al 70 %, lo que debilita enormemente las paredes celulares (a menudo muy duras), si no las destruye. Tras alrededor de un minuto se añade una cantidad aproximadamente igual de acetónitrilo, con lo cual se destruyen finalmente las paredes celulares como resultado de la fuerza osmótica y se liberan las proteínas del interior del microbio. La disolución se centrifuga una vez más para separar los componentes sólidos como los fragmentos de pared celular. El sobrenadante, que ahora contiene las proteínas patógenas, se somete al análisis por espectrometría de masas vertiendo unas gotas en el soporte de muestras para espectrometría de masas con ayuda de una pipeta.

- Existen placas prefabricadas de soporte de muestras que contienen puntos con finas capas de matriz, en los cuales se puede pipetear el líquido de extracción; las matrices se disolverán parcialmente debido al acetonitrilo añadido. Como resultado, las proteínas se incrustan en los pequeños cristales durante la recristalización a medida que se seca la disolución. Otros tipos de placas de muestra contienen puntos hidrofílicos dentro de un ambiente hidrofóbico; el líquido de extracción se puede pipetear en los puntos hidrofílicos, mezclado con una disolución de matriz, después de lo cual se seca durante unos pocos minutos al aire, por ejemplo, con un chorro de aire caliente o en un recipiente al vacío. O bien la disolución de la matriz ya se puede añadir al líquido de extracción.
- Además de este método de descomposición utilizando sustancias químicas y fisicoquímicas como los ácidos o disolventes orgánicos para la ósmosis, se puede también lograr o contribuir a la descomposición utilizando métodos muy diferentes, como destruir las paredes celulares por medios físicos. Las paredes celulares se pueden destruir, por ejemplo, por irradiación acústica, como en un baño de ultrasonidos. También se pueden emplear métodos mecánicos, como una micromano de mortero para aplastar o machacar los microbios directamente en el recipiente de centrifugado.
- El método de descomposición suministra espectros de masa muy puros y claros en un intervalo de masas desde 1000 daltonios aproximadamente sin ninguna interferencia de fondo y solo requiere unos minutos adicionales. Por tanto, se puede aplicar fácilmente como método estándar para evitar el a veces problemático y potencialmente peligroso «frotis» de los microbios intactos, aún vivos y muy infecciosos. Si se dispone inmediatamente de un espectrómetro de masas, la identificación se puede obtener en menos de media hora.
- El espectro de masa representa principalmente el perfil de las proteínas solubles de los microorganismos patógenos; las proteínas insolubles de la pared celular de los microbios no se pueden apreciar generalmente en el espectro de masa. Como bien sabe el especialista en la materia, se puede incrementar la solubilidad de las proteínas de baja solubilidad, como las proteínas de las envolturas de los virus, mediante el empleo de disolventes especiales. Es bastante posible que aparezcan en el espectro de masa algunas sustancias que no son proteínas; no obstante, con fines de simplificación, el término «perfiles proteínicos» se utilizará aquí para referirse a los espectros de masa de los microorganismos patógenos.
- Para el análisis por espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz, la placa de soporte de muestras con las muestras secas se inserta en el sistema de vacío de un espectrómetro de masas mediante un cierre de vacío. Los cristales de la matriz con las proteínas incrustadas se exponen a continuación a la luz de un láser pulsado en la fuente de iones del espectrómetro de masas, lo que crea una nube de plasma formada por las moléculas de las proteínas ionizadas; las masas iónicas de los diferentes tipos de iones de proteínas se pueden medir entonces en el espectrómetro de masas. Para este fin es preferible utilizar un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo con una ruta de vuelo lineal, sin emplear un reflector. El espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo separa los iones acelerados eléctricamente porque, dada la misma energía por la misma fuerza de aceleración en el campo eléctrico, los iones más pesados tienen una velocidad de vuelo inferior a los iones más ligeros. La medición con resolución temporal de la corriente iónica con un detector ubicado en el extremo de la ruta de vuelo constituye directamente, por tanto, un espectro de masa de los iones ligeros a los pesados, ya que se conoce la relación entre los tiempos de vuelo y las masas. El espectro de masa es el perfil de la intensidad de los valores de masa de las proteínas, cada una con masas características determinadas genéticamente.
- El fluido sobrenadante también se puede analizar mediante ionización por electronebulización, por ejemplo, en un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo con aceleración iónica ortogonal (ESI-OTOF-MS). Los espectros de masa obtenidos poseen una elevada resolución de masa, pero tienen aspectos muy diferentes porque la ionización por electronebulización genera iones multiprotonados, en particular en el caso de iones del interesante intervalo de masas de $m =$ de 1000 a 20000 daltonios. No obstante, existen métodos para calcular un espectro de masa virtual de los iones de las proteínas, con la apariencia que tiene cuando solo consta de iones con cargas simples. Los programas informáticos aprovechan el hecho de que la elevada resolución de masa muestra el patrón isotópico y con ello el número de cargas para cada tipo de ion proteínico. Por otro lado, existen métodos para desprotonar los iones hasta obtener iones con carga simple añadiendo aniones desprotonadores a los iones de proteínas multicargados en células reactivas especiales.
- El espectro de masa de las proteínas del microorganismo patógeno debe entonces compararse con los espectros de referencia de una colección y de esta forma se identifican los microorganismos patógenos sobre la base de criterios de similitud entre los espectros de masa. Este método forma parte del estado de la técnica y es conocido por los expertos. En muchos lugares se están desarrollando colecciones fiables de espectros de masa de los perfiles proteínicos de microbios, adecuadas para aplicaciones médicas y legales (de las que se dice que están «validadas»), incluidos diversos institutos nacionales centrales, por ejemplo, para la supervisión y prevención de enfermedades. Existen colecciones que contienen espectros de referencia validados para alrededor de 1500 especies microbianas y alrededor de 3000 cepas; estas colecciones se amplían día a día.
- Por lo tanto, la invención se basa en lo que, esencialmente, es un método conocido de identificación de microbios mediante espectrometría de masas, pero sin la normalmente necesaria y larga preparación de cultivos microbianos

en un medio nutritivo externo. La invención obtiene los microorganismos patógenos directamente del fluido corporal, en el que están presentes, en casos de infecciones agudas, con suficiente pureza en lo que respecta a la especie, en contraste con los microbios hallados en otros lugares dentro o fuera del cuerpo humano.

5 El método es por tanto sorprendentemente simple. Se basa fundamentalmente en la observación de que en la gran mayoría de las infecciones agudas se encuentra en el fluido corporal solo una o como mucho dos especies de microorganismos patógenos por encima del umbral de detección. Y su concentración es sorprendentemente elevada. Como resultado, cuando estos patógenos se sedimentan a partir del fluido corporal en una centrifugadora, las cantidades de microorganismos patógenos obtenidas proporcionan suficiente cantidad de muestra para la medición, por un lado, y representan cultivos de microorganismos patógenos suficientemente puros, por el otro. Incluso en caso de presencia de dos especies de microorganismos patógenos el método funciona de forma satisfactoria.

10 Por lo tanto, con este método se evita la separación de especies de microorganismos patógenos puros, que de lo contrario se obtiene mediante el costoso cultivo de colonias separadas en medios nutritivos.

15 En algunos casos el método de acuerdo con la invención ofrece incluso ventajas frente a la purificación de especies de microorganismos patógenos mediante el cultivo porque hay microorganismos patógenos que no se pueden cultivar en los medios nutritivos externos habituales, como las bacterias *Chlamydia* y *Rickettsia*, muy frecuentes y altamente infecciosas, que solo proliferan dentro de otras células. *Chlamydia* y *Rickettsia* son especies microbianas que solo proliferan dentro de células huésped pero, al contrario de los virus, desarrollan su propio metabolismo. Las bacterias *Chlamydia* solo proliferan en la forma de «cuerpos reticulares» dentro de las células huésped; fuera de las células huésped se hallan únicamente como «cuerpos elementales», prácticamente sin metabolismo. Se pueden detectar en el primer chorro de orina o en la secreción del área genital, si están presentes como infección genital (la enfermedad de transmisión sexual más habitual en Europa con diferencia). Las bacterias *Chlamydia* también causan enfermedades oculares (con pérdida de visión, habitual en África) y enfermedades pulmonares; se pueden hallar en el líquido sinovial de la articulación de la rodilla y en muchos otros órganos como peligrosos microorganismos patógenos, pero detectarlas no es sencillo. Actualmente la identificación satisfactoria solo es posible mediante secuenciación del ADN tras amplificación por PCR; en otras palabras, un método que requiere mucho tiempo.

20 De la misma forma, se pueden obtener virus en forma de viriones a partir de fluidos corporales mediante ultracentrifugado en cantidades lo suficientemente grandes para permitir la identificación mediante espectrometría de masas. El espectro de masa muestra aquí principalmente las proteínas de la envoltura de la cápside y, en ocasiones, la envoltura lipoproteínica adicional. Las proteínas de la envoltura se producen en la célula huésped específicamente sobre la base de la información genética del virus, y son por tanto muy características de la especie vírica concreta. Puede haber treinta o más proteínas diferentes que se combinan para formar una envoltura vírica de forma regular. Las proteínas de la envoltura requieren un proceso de descomposición especial para su disolución e incorporación a los cristales de la matriz. La envoltura lipoproteínica, que está presente en algunos tipos de viriones, se forma cuando los viriones que han madurado en la célula son expulsados a los alrededores a través de excrecencias particulares de la membrana celular; los viriones se llevan entonces las lipoproteínas con ellos.

25 La aplicabilidad del método a los virus y a las bacterias *Rickettsia* y *Chlamydia* proporciona a la invención una importancia especial y extraordinaria, ya que la identificación microbiológica de estos microorganismos patógenos es un proceso largo y difícil. No se pueden cultivar en medios nutritivos estándares, sino que requieren células huésped para proliferar. La identificación microbiológica fiable se realiza mediante secuenciación del ADN y a menudo requiere una semana o más, mientras que la identificación por espectrometría de masas lleva solo unas pocas horas o incluso menos.

30 Aunque la ciencia no considera actualmente que los virus sean organismos vivos, en este documento se incluyen, como es habitual, bajo el término «microorganismos patógenos». Las bacterias *Rickettsia* y, en particular, las *Chlamydia*, que hasta la década de los setenta se clasificaban como virus, son ahora consideradas oficialmente microbios.

35 Los fluidos corporales de interés son principalmente los fluidos transparentes. Entre estos se incluyen fluidos excretados por el cuerpo, como la orina, el líquido lacrimal, el esputo y la secreción nasal, pero también fluidos corporales internos, como la linfa, el líquido sinovial (obtenido mediante artrocentesis) o el líquido cefalorraquídeo (obtenido mediante punción lumbar). En presencia de infecciones agudas, estos fluidos contienen grandes cantidades de microorganismos patógenos, entre 10^4 y 10^8 microorganismos patógenos por mililitro. Si estos fluidos, por ejemplo, la secreción nasal, contienen sustancias mucosas (habitualmente disoluciones de proteínas), se pueden diluir con líquidos adecuados para facilitar la separación de los microbios.

40 Los microorganismos patógenos responsables de la inflamación de las vías urinarias se pueden detectar en la orina, por ejemplo. Los microorganismos patógenos causantes de la meningitis (de 20 a 30 tipos diferentes) se pueden encontrar en el líquido cefalorraquídeo.

Los fluidos corporales que contienen un gran número de partículas, como la sangre total, el pus o las secreciones turbias, también se pueden identificar mediante el método de acuerdo con la invención, pero requieren pasos adicionales para destruir y extraer las partículas.

5 El método se puede aplicar a la sangre total infectada de la siguiente forma: si la sangre total contiene ya suficientes microorganismos patógenos, como en el caso de septicemia aguda, los microorganismos patógenos se pueden separar directamente junto con las partículas sanguíneas mediante centrifugado. Si el sedimento se disuelve a continuación en agua destilada, las partículas sanguíneas, cuyas membranas celulares son débiles, se destruyen por ósmosis, pero no así los microbios. El lavado y nuevo centrifugado deposita a continuación un sedimento que
10 contiene microbios muy enriquecidos. La descomposición y el análisis por espectrometría de masas conduce aquí a menudo directamente a un éxito muy rápido, tal y como se requiere en caso de septicemia aguda.

Si la cantidad de microorganismos patógenos en la sangre no es suficiente para este método directo, entonces los microorganismos patógenos se pueden cultivar en sangre total dentro de la bolsa de sangre. Se puede añadir algún medio nutritivo a la sangre con este fin y la bolsa de sangre se coloca en una incubadora a una temperatura favorable. En los casos favorables este método puede multiplicar por diez aproximadamente el número de microorganismos patógenos en una hora; no obstante, para cultivar suficiente cantidad del microorganismo patógeno causante de la infección se suelen requerir varias horas. Aun así sigue siendo mucho más rápido que el cultivo en un medio nutritivo externo. Puede ser necesario añadir sustancias adecuadas a la sangre, como resinas de intercambio iónico, para que se fijen a los antibióticos que hayan podido administrarse al paciente. El éxito del cultivo de microorganismos patógenos en sangre total se puede detectar por la formación de gas (dióxido de carbono) generado por los microorganismos patógenos que están proliferando.

25 Se espera que, con una preparación adecuada, los microorganismos patógenos presentes en la secreción de abscesos (pus) se puedan medir directamente, aunque es posible que ninguna especie concreta de microorganismos patógenos predomine lo suficiente como para permitir una identificación sin otra purificación.

Si se espera que los microorganismos patógenos a identificar se encuentren dentro de las células humanas contenidas en el fluido corporal, entonces el procedimiento descrito para la sangre total se puede aplicar al tejido homogeneizado. Tras el centrifugado, las células humanas se pueden destruir mediante agua destilada, ya que la fuerza osmótica hace estallar su membrana.

35 Los expertos que conozcan la invención pueden modificar de muchas formas los métodos aquí descritos. Algunas de estas modificaciones ya se han indicado más arriba; pero sin duda hay otros métodos que, sobre la base del principio fundamental de la separación directa, pueden generar los tan informativos espectros de masa que se requieren para la identificación de los microorganismos patógenos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la identificación de microorganismos patógenos mediante espectrometría de masas en una muestra de sangre total, con los siguientes pasos:
- (a) destrucción de las partículas sanguíneas en la muestra de sangre total,
 (b) precipitación mediante centrifugado de los microorganismos patógenos sin posterior multiplicación directamente desde la muestra de sangre total a un sedimento,
 10 (c) análisis por espectrometría de masas de las proteínas de los microorganismos patógenos, e
 (d) identificación de los microorganismos patógenos mediante comparación de los espectros de masa de la proteína con los espectros de masa de proteínas de referencia.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1 en el cual en el paso c) se hace un frotis de los microorganismos patógenos del sedimento directamente en las placas de soporte de muestras para espectrometría de masas y se rocía con un poco de disolución de matriz para efectuar una ionización de sus proteínas mediante desorción láser asistida por matriz.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1 en el cual en el paso c) las proteínas se extraen de los microorganismos patógenos mientras el sedimento con los microorganismos patógenos sigue en el tubo de centrifugado y el fluido de extracción se somete a espectrometría de masas de las proteínas.
- 25 4. Un método según la reivindicación 3 en el cual para la extracción de las proteínas los microorganismos patógenos del sedimento se descomponen mediante medios químicos, fisicoquímicos o físicos.
- 30 5. Un método según las reivindicaciones 3 o 4 en el cual el fluido de extracción se somete a análisis por espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización.
6. Un método según las reivindicaciones 3 o 4 en el cual el fluido de extracción se somete a análisis por espectrometría de masas mediante ionización por desorción láser asistida por matriz.
- 35 7. Un método según la reivindicación 6 en el cual el fluido de extracción se vierte en una placa de soporte de muestras para espectrometría de masas en la cual se ha depositado ya una capa de cristales de matriz.
8. Un método según la reivindicación 6 en el cual se añade una disolución de la matriz al fluido de extracción antes de verterlo en la placa de soporte de muestras.
- 40 9. Un método para la identificación de microorganismos patógenos mediante espectrometría de masas en una muestra de sangre total, con los siguientes pasos:
- (a) multiplicación de los microorganismos patógenos en la muestra de sangre total mediante incubación,
 (b) destrucción de las partículas sanguíneas en la muestra de sangre total,
 (c) precipitación mediante centrifugado de los microorganismos patógenos sin posterior multiplicación directamente desde la muestra de sangre total a un sedimento,
 45 (d) análisis por espectrometría de masas de las proteínas de los microorganismos patógenos, e
 (e) identificación de los microorganismos patógenos mediante comparación de los espectros de masa de la proteína con los espectros de masa de proteínas de referencia.
- 50 10. Un método según la reivindicación 9 en el cual se añaden nutrientes antes de la incubación.
11. Un método según las reivindicaciones 9 o 10 en el cual la detección de gas en la muestra de sangre total incubada se utiliza como primera indicación de una infección aguda.
- 55 12. Un método para la identificación de microorganismos patógenos mediante espectrometría de masas en una muestra de sangre total, con los siguientes pasos:
- (a) separación mediante centrifugado de los microorganismos patógenos junto con las partículas sanguíneas con obtención de un sedimento,
 (b) disolución del sedimento en agua destilada y destrucción de las partículas sanguíneas en el sedimento mediante ósmosis,
 60 (c) depósito de un sedimento con microorganismos patógenos enriquecidos mediante lavado y centrifugado,
 (d) análisis por espectrometría de masas de las proteínas de los microorganismos patógenos, e
 (e) identificación de los microorganismos patógenos mediante comparación de los espectros de masa de la proteína con los espectros de masa de proteínas de referencia.